

Veränderungen im Ribonukleinsäure- und Eiweißstoffwechsel verschiedener Zellarten unter dem Einfluß von Äthionin.

Von

V. Beck*, D. Kramsch u. W. Oehlert

Aus dem Ludwig-Aschoff-Haus,
dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
Direktor: Prof. Dr. H. U. ZOLLINGER

Mit 2 Figuren, 8 Abbildungen und 2 Tabellen im Text

(Eingegangen am 20. Januar 1965)

Äthionin, eine schwefelhaltige Aminosäure, bei welcher der Methylrest des Methionin durch einen Äthylrest ersetzt ist, führt nach parentaler Applikation beim Warmblüter zu den unterschiedlichsten Zell- und Gewebsveränderungen.

Die am schwersten durch Äthioninapplikation geschädigten Organe sind exkretorische Drüsen, wie Pankreas, Speicheldrüsen und laktierende Brustdrüsen, und das Leberparenchym. Die in diesen Geweben beobachteten Zell- und Gewebsveränderungen sind charakterisiert durch einen Verlust der cytoplasmatischen Basophilie, dem im elektronenmikroskopischen Bild ein Abbau der Strukturen des Ergastoplasmas zugrunde liegt (SEIFERT u. GIESEKING 1961; HERMAN u. FITZGERALD 1962; BÄSSLER u. GRILLMAIER 1963). Nach Absetzen der Äthioninapplikation kommt es zu ausgedehnten regenerativen Vorgängen, vor allem in Leber und

* Dissertationsarbeit von Frl. BECK.

Pankreas, die zu einer Restitutio ad integrum führen können (HERMAN u. FITZGERALD 1962; KRAMSCH, BECK u. OEHLERT 1963).

Das Schädigungsmuster des Äthionin im Warmblüterorganismus – bei den geschädigten Geweben handelt es sich ausschließlich um solche mit einem großen Eiweißumsatz – führte zu der Annahme, daß Äthionin statt Methionin in Proteine eingebaut (V. BECKER 1956) und zur Bildung atypischer Proteine führen würde (zusammenfassende Literatur bei FITZGERALD u. HELLMAN 1961).

Von anderen Untersuchern wurde demgegenüber angenommen, daß die zellschädigende Wirkung des Äthionin weniger auf einen Einbau in Proteine als vielmehr auf eine direkte Einwirkung des Äthionin auf die cytoplasmatische RNS zurückzuführen sei (FARBER u. MAGEE 1960).

Die Beobachtung, daß Äthionin bei längerer Applikation zur Bildung hepatozellulärer Carcinome führt (FARBER 1956), und die weitgehende Übereinstimmung zwischen den durch Äthionin hervorgerufenen und den durch andere Lebercarcinogene bewirkten Veränderungen der Leberparenchymzelle veranlaßten uns, erneut der Frage nach dem Schädigungsmechanismus des Äthionin nachzugehen.

Versuchsanordnung und Technik

Unsere Versuche hatten zum Ziel, Aufschlüsse über die Wirkung der akuten und chronischen Äthioninvergiftung auf den Protein- und RNS-Stoffwechsel zu erlangen. Bei akuter Äthioninvergiftung erhielten junge, weibliche 110 bis 120 g schwere weiße Ratten im Abstand von 12 Stunden 2 intraperitoneale Injektionen von je 50 mg Äthionin. Die Untersuchung erfolgte 60 Minuten nach der letzten Injektion. Die chronische Äthioninvergiftung wurde durch 6 bzw. 12 Tage lang durchgeführte intraperitoneale Injektionen von einmal täglich 50 mg hervorgerufen. Die Untersuchung erfolgte 12 Stunden bzw. 3 Tage nach der letzten Injektion.

Zur Untersuchung des Proteinstoffwechsels (Gruppe 1 in Tab. 1) erhielten die Tiere bei akuter und chronischer Äthioninvergiftung durch intraperitoneale Injektion 1 mC ^3H -dl-Leucin und wurden 60 Minuten später durch Dekapitation getötet.

Zur Untersuchung des RNS-Stoffwechsels verabreichten wir sowohl bei akuter als auch bei chronischer Äthioninvergiftung (Gruppen 2 bis 5 in Tab. 1) durch intraperitoneale Injektion 1 mC ^3H -Cytidin pro Tier. Ein Teil der Tiere wurde 60, ein anderer 240 Minuten nach Injektion durch Dekapitation getötet.

Unmittelbar nach Dekapitation wurden Organe der Tiere von Gruppe 1 in Formalin-Trichloressigsäure (Formalin 10% plus 0,5% Trichloressigsäure) und Organe der Tiere von Gruppe 2 in neutralem Formalin (10% neutrales, gepuffertes Formalin) fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden 5 μ dicke Gewebsschnitte hergestellt, die unter Verwendung von flüssiger Emulsion (Ilford G 5 und K 2) zu Autoradiogrammen verarbeitet wurden. Die Belichtungszeiten betrugen 8 (G 5) bis 21 (K 2) Tage. Die Färbung der Autoradiogramme erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin oder mit Kresylviolett.

Zur Untersuchung gelangten folgende Organe: Leber, Vor- und Drüsenmagen, Pankreas und Dünndarm. Dabei waren Pankreas und Dünndarm so präpariert

Tabelle 1
Versuchsordnung

Versuchs- gruppe	Tier- zahl	Äthionin-Appl. Behandl.-Dauer	Art der Aktivität Zeitpunkt der Inj.	Zeit zwischen Akt. Inj. und Unter- suchung
1 a	2	2mal 50 mg im Ab- stand von 12 Std.	³ H-dl-Leucin, 1 mC 60 Min. nach letzter Äthionininjektion	60 Min.
1 b	2	6 Tage lang täglich 50 mg Äthionin	³ H-dl-Leucin, 1 mC 12 Std. nach letzter Äthionininjektion	60 Min.
1 c Kontr.	1	—	³ H-dl-Leucin, 1 mC	60 Min.
2 a	2	2mal 50 mg im Ab- stand von 12 Std.	³ H-Cytidin, 1 mC 60 Min. nach letzter Äthionininjektion	60 Min.
2 b	2	2mal 50 mg im Ab- stand von 12 Std.	³ H-Cytidin, 1 mC 60 Min. nach letzter Äthionininjektion	4 Std.
3 a	2	12 Tage lang täglich 50 mg Äthionin	³ H-Cytidin, 1 mC 12 Std. nach letzter Äthionininjektion	60 Min.
3 b	2	12 Tage lang täglich 50 mg Äthionin	³ H-Cytidin, 1 mC 12 Std. nach letzter Äthionininjektion	4 Std.
4 a	2	12 Tage lang täglich 50 mg Äthionin	³ H-Cytidin, 1 mC 3 Tage nach letzter Äthionininjektion	60 Min.
4 b	2	12 Tage lang täglich 50 mg Äthionin	³ H-Cytidin, 1 mC 3 Tage nach letzter Äthionininjektion	4 Std.
5 a Kontr.	1	—	³ H-Cytidin, 1 mC	60 Min.
5 b	1	—		4 Std.

worden, daß beide Organe bei jedem Versuchstier auf einem Gewebsschnitt ange-
schnitten und somit auf einem Objektträger waren.

Entparaffinierte Schnitte der Versuchsgruppen 2 bis 5 (Cytidin) wurden vor der
Herstellung von Autoradiogrammen in hochkonzentrierte Lösung unmarkierten Cyti-
dins gestellt (120 Minuten). Von jeder Versuchsserie der Gruppen 2 bis 5 wurden 2
Schnitte jeden Gewebes 3 Stunden lang bei 37° C der Einwirkung einer Ribonuklease-
lösung (1 mg/ml Ribonuclease crist. Bovine Origin Fa. Armour & Co., Chicago) aus-
gesetzt und anschließend in Cytidinlösung gespült.

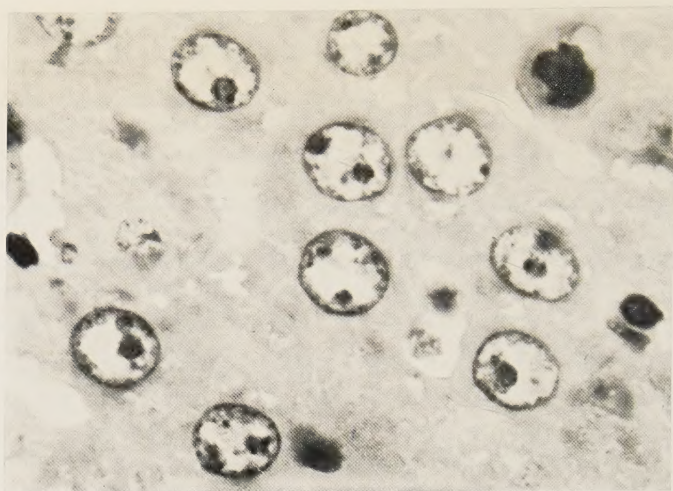


Abb. 1. Leberepithel nach 2mal 50 mg Äthionin innerhalb von 24 Stunden, 120 Minuten nach letzter Injektion. H.-E.-Färbung. Verlust der kernnahen basophilen Schollen im Cytoplasma. Aufhellung des Karyoplasmas mit angedeuteter Kernwandhyperchromasie.

Quantitative Auswertung der Autoradiogramme

In der 1. Versuchsgruppe (Proteinstoffwechsel) wurden Vor- und Drüsenmagen zur quantitativen Auswertung herangezogen. Beide Gewebe befanden sich stets auf einem Schnitt und einem Objektträger, so daß identische Belichtungs- und Entwicklungsbedingungen der Autoradiogramme gewährleistet waren. Die Silberkornzählungen wurden einmal über den Hauptzellen des Drüsenmagens und zum anderen über dem mehrschichtigen Pflasterepithel des Vormagens unmittelbar an der Grenze zum Drüsenmagen vorgenommen. Innerhalb eines im Okular befestigten Meßquadrates von etwa 20μ Kantenlänge wurden bei einer Vergrößerung von 1000 im Leitz-Laborlux-Mikroskop in Autoradiogrammen mit K 2-Emulsion Silberkörner ausgezählt. Von jeder Versuchszeit wurden 5 Präparate zur Auswertung herangezogen, in denen jeweils 100 Quadrate ausgezählt wurden. Aus den Zählergebnissen wurden die Mittelwerte ermittelt, die in Figur 1 angegeben sind.

In der 2. bis 5. Versuchsgruppe erfolgte die quantitative Auswertung nur an der Leber, wobei Sternzellen und Leberepithelien beurteilt wurden. Hierbei wurden die Silberkornzahlen pro Zellkern ermittelt. Die Kernfläche wurde nicht ausgemessen. Zur Auswertung wurden nur Zellkerne herangezogen, bei denen der Nukleolus angeschnitten war (Leberepithelien). Von den Sternzellen wurden nur die Zellkerne beurteilt, die längsoval angeschnitten waren. Von jeweils 200 in 5 verschiedenen Autoradiogrammen der gleichen Versuchszeit ausgezählten Zellkernen wurden Mittelwerte bestimmt, die in Figur 2 angegeben sind.

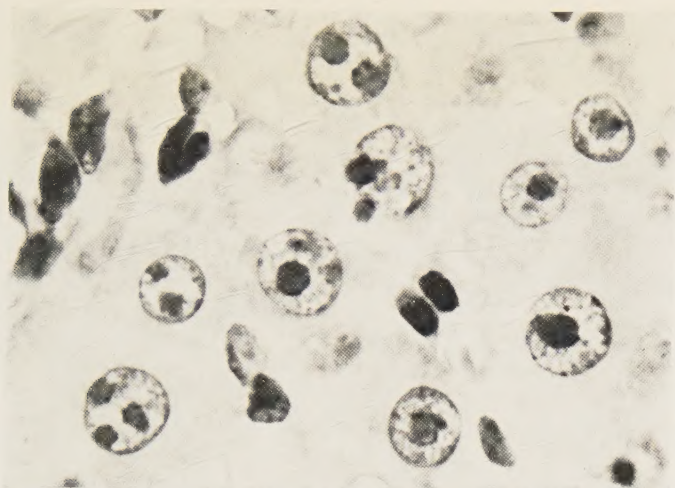


Abb. 2. Leberepithel nach 12tägiger Äthioninvergiftung, 3 Tage nach letzter Injektion. H.-E.-Färbung. Kern- und Nukleolenvergrößerung und netzartiges Chromatingerüst in Leberepithelien.

Ergebnisse

Weder bei akuter noch bei chronischer Äthioninvergiftung (Versuchsgruppen 2 und 3) konnten am mehrschichtigen Pflasterepithel des Vormagens, an der Dünndarmschleimhaut und an den Ganglienzellen des Plexus myentericus im Magen und Dünndarm Veränderungen nachgewiesen werden.

Im Lebergewebe wurden bei akuter Äthioninvergiftung Veränderungen an Kern und Cytoplasma der Leberepithelien gefunden, die sich vor allem in einer Abnahme der cytoplasmatischen Basophilie mit Verlust der kernnahen basophilen Schollen und in einer Aufhellung des Zellkerns mit Bildung optisch leerer, unregelmäßig begrenzter Räume manifestierten (Abb. 1). Die Nukleolen ließen zentrale Aufhellungen erkennen, die durch einen schmalen Saum des Nukleolus assoziierten Chromatins begrenzt wurden. Vor allem in peripheren Läppchenabschnitten wurden vereinzelt Leberzellnekrosen gefunden, die von gelapptkernigen Leukocyten umgeben waren. Die Kupfferschen Sternzellen zeigten eine Kernvergrößerung, wobei eine Auflockerung des Chromatingerüsts sowie das Auftreten von Nukleolen besonders auffielen. Es bestand eine nur geringgradige, feintropfige Leberzellverfettung mit Bevorzugung peripherer Läppchenabschnitte. Bei der chronischen Äthioninvergiftung kam es zu einer Verstärkung der auch bei akuter Vergiftung nachweisbaren Zell- und Gewebsveränderungen. Grundsätzlich neue, von der akuten Vergiftung unterschiedliche Veränderungen konnten nicht aufgefunden werden.

In der Erholungsphase, 3 Tage nach der letzten Äthioninapplikation, fiel vor allem die erhebliche Größenzunahme der Nukleolen auf, die als meist solide kugelartige Gebilde inmitten eines feinen Chromatinnetzes lagen (Abb. 2). Nur vereinzelt konnte eine zentrale Aufhellung beobachtet werden. Stellenweise ließen sich Aus-

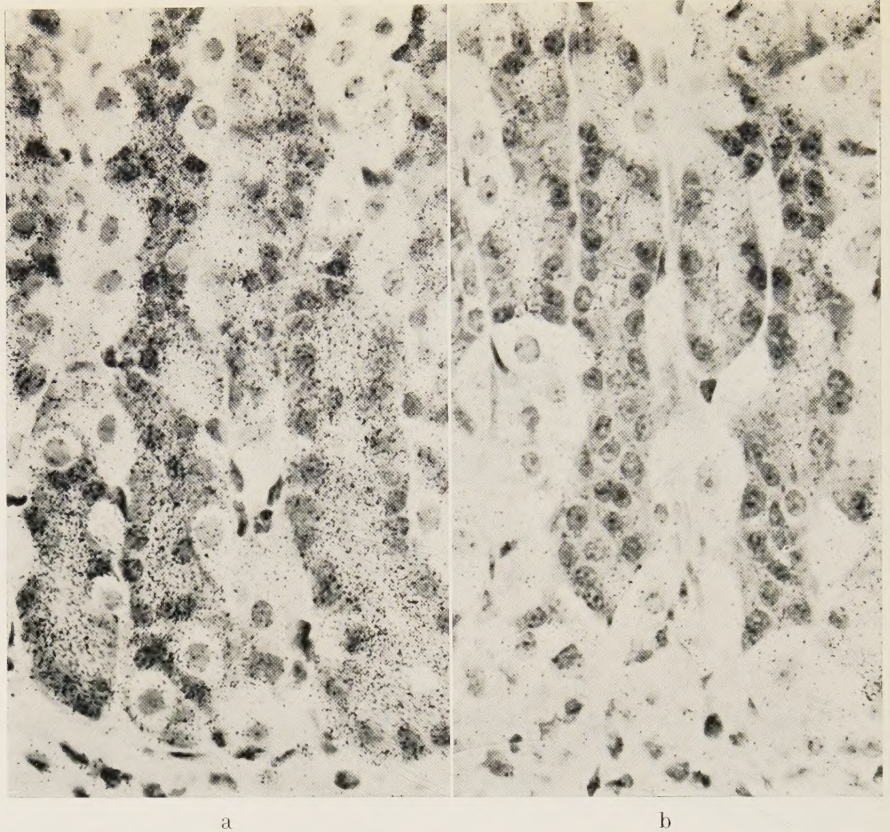


Abb. 3a. Autoradiogramme des Drüsenmagens, 60 Minuten nach Injektion von ^3H -dl-Leucin. H.-E.-Färbung. Starke Silberkorndichte (Proteinsynthese) über den Hauptzellen des Drüsenmagens.

Abb. 3b. Autoradiogramme des Drüsenmagens, 60 Minuten nach Injektion von ^3H -dl-Leucin nach chronischer Äthioninvergiftung. H.-E.-Färbung. Beträchtliche Abnahme der Silberkorndichte (Proteinsynthese) über den Hauptzellen des Drüsenmagens.

schleusungsvorgänge von Nukleolarsubstanz erkennen. (Einzelne Nukleolen lagen einschließlich ihrer Chromatinschale neben den Zellkernen. Wie Kontrollschnitte mit einer Schnittdicke von $15\ \mu$ gezeigt haben, handelte es sich hierbei um Schnittartefakte und nicht um eine Ausstoßung von Nukleolen.) Im Cytoplasma konnten fettfreie Vakuolen nachgewiesen werden, außerdem fanden sich zahlreiche Mitosen vor allem in peripheren Läppchenabschnitten.

Im Pankreas fanden sich sowohl bei akuter als auch bei chronischer Äthioninvergiftung die bereits von zahlreichen anderen Autoren beschriebenen Veränderungen am exokrinen Drüsengewebe. Auch hierbei standen zunächst die Abnahme der cytoplasmatischen Basophilie und Kernvakuolisierungen im Vordergrund. In weit größerer

Ausdehnung als im Lebergewebe kam es dann aber zu ausgedehnten Nekrosen mit leukocytärer Reaktion und lebhafter Bindegewebsneubildung. In der Erholungsphase fanden sich lebhaftere Regenerationsvorgänge am erhalten gebliebenen Parenchym mit zahlreichen Mitosen in den vakuolisierten Pankreasepithelien.

Die Hauptzellen im Drüsenmagen reagierten auf die akute Äthioninvergiftung mit einer Abnahme der cytoplasmatischen Basophilie, mit Vakuolisierungen und Nekrosen. Bei chronischer Vergiftung hatte man Mühe, innerhalb der abgeflachten Magenschleimhaut noch Hauptzellen nachzuweisen. In der Erholungsphase ließen sich zahlreiche Mitosen in Zellen nachweisen, die ihrer Lage nach als Hauptzellen anzusprechen waren.

Veränderungen der Eiweißneubildung während der Äthioninvergiftung

Im mehrschichtigen Pflasterepithel des Vormagens, in der Dünndarmschleimhaut, in den Ganglienzellen des Plexus myentericus und in Sternzellen konnte ein Einfluß der Äthioninvergiftung auf die relative Größe der Eiweißneubildung nicht nachgewiesen werden.

In den Epithelien des exokrinen Pankreasgewebes, in Hauptzellen des Drüsenmagens und in Leberepithelien dagegen fand sich eine erhebliche Abnahme des Einbaues markierten Leucins, an der Silberkorndichte pro Flächeneinheit gemessen. In Figur 1 sind die Ergebnisse der Silberkornzählungen angegeben. Dabei wurden die für das mehrschichtige Pflasterepithel des Vormagens ausgezählten Werte als 1 gesetzt und die Silberkornzahlen für Hauptzellen (im gleichen Präparat ausgezählt) und Leberepithelien damit verglichen. Die angegebenen Werte lassen die er-

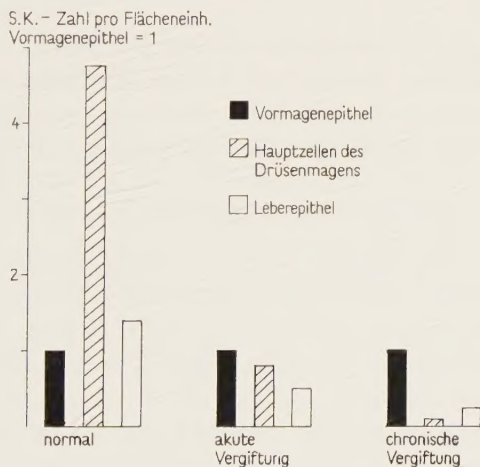


Fig. 1. Bestimmung der relativen Größe der Proteinsynthese bei akuter und chronischer Äthioninvergiftung durch Vergleich der Silberkorndichte in Autoradiogrammen nach Applikation ^3H -dl-Leucin.

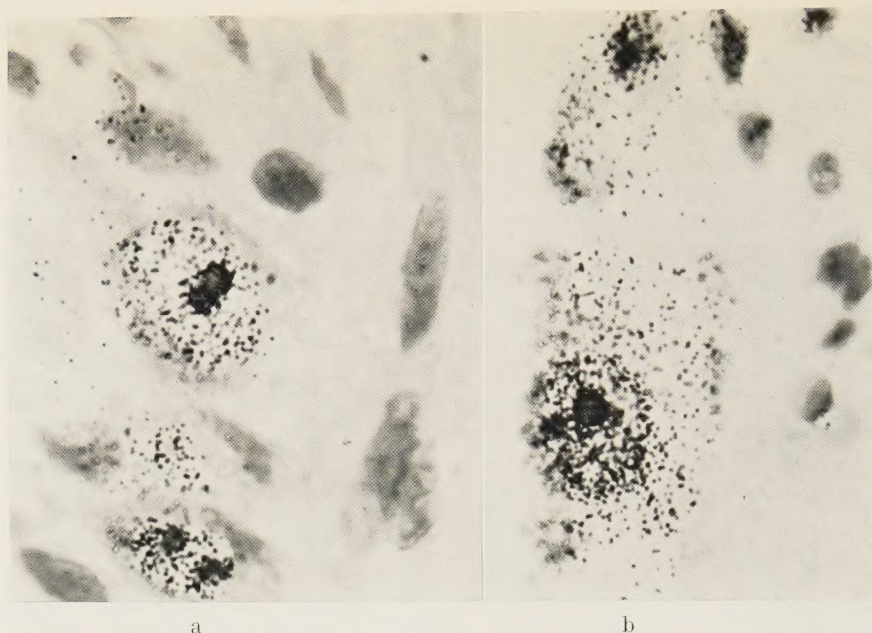


Abb. 4. Autoradiogramme von Ganglienzellen des Plexus myentericus im Dünndarm, 60 Minuten (a) und 4 Stunden (b) nach Injektion von ^3H -Cytidin. H.-E.-Färbung. Ausschließliche Markierung des Zellkerns mit besonderer Betonung des Nukleolus 60 Minuten (a) nach Injektion von ^3H -Cytidin. Kräftige Markierung des Cytoplasmas bei weiterhin bestehender Silberkornbelegung des Zellkerns 4 Stunden (b) nach Injektion.

hebliche Senkung der Leucininkorporation, das heißt der Proteinsynthese, unter dem Einfluß der akuten und chronischen Äthioninintoxikation erkennen. In Abbildung 3a wird die Abnahme der Silberkornzahl pro Flächeneinheit über den Hauptzellen des Drüsenmagens deutlich.

Untersuchungen zur RNS-Neubildung

60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin findet sich im Autoradiogramm aller untersuchten Gewebe ausschließlich über den Zellkernen eine Silberkornbelegung. Die größte Silberkorndichte liegt über dem Nukleolus, doch auch über dem Kernchromatin bestehen Ansammlungen von Silberkörnern.

4 Stunden nach Injektion von ^3H -Cytidin besteht über dem Kern noch immer der gleiche Verteilungstyp der Silberkörner, doch findet man jetzt auch Ansammlungen von Silberkörnern über dem Cytoplasma. Besonders deutlich lassen sich diese Verteilungsverhältnisse an den verhält-

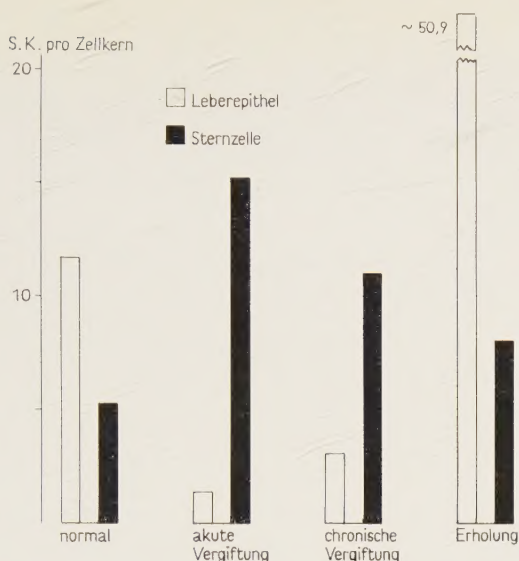


Fig. 2. Bestimmung der relativen Größe der RNS-Neubildung bei Leberepithelien und Sternzellen nach akuter und chronischer Äthioninvergiftung durch Vergleich der Silberkornzahl pro Zellkern im Autoradiogramm.

nismäßig großen Zellkernen der Ganglienzellen des Plexus myentericus nachweisen (Abb. 4a, b).

Bei einem qualitativen Vergleich der verschiedenen untersuchten Gewebe ergibt sich hinsichtlich der Silberkornzahl pro Zellkern folgende Reihenfolge: Dünndarmepithel und Ganglienzellen des Plexus myentericus, mehrschichtiges Pflasterepithel des Vormagens, Leber- und Pankreasepithelien und Hauptzellen des Drüsenmagens, Sternzellen der Leber, Muskulatur und Bindegewebe in Dünndarm und Magen. Eine Auszählung von Silberkörnern pro Zellkern im Lebergewebe ergibt die in Figur 2 zusammengefaßten Werte für Leberepithelien und Sternzellen.

Veränderungen der RNS-Neubildung unter der Äthioninintoxikation

Bereits nach 2maliger Applikation von 50 mg Äthionin beobachtet man im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Cytidin eine Veränderung des Einbaumusters in Gewebsschnitten, in denen Dünndarm und Pankreas gleichzeitig getroffen sind. Unter normalen Bedingungen findet man hier eine große Silberkorndichte über den Dünndarmepithelien und

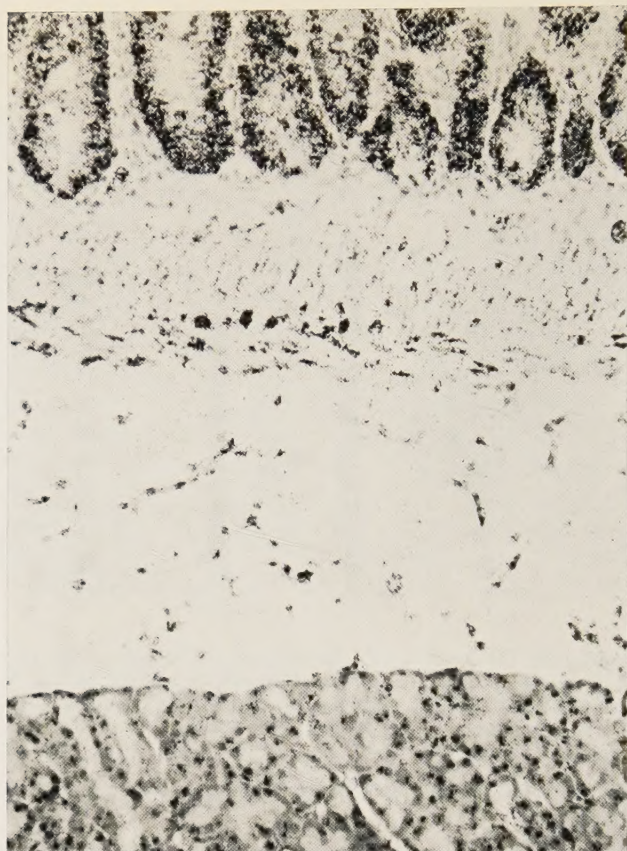


Abb. 5. Autoradiogramm von Pankreas und Dünndarm, 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin beim Kontrolltier. H.-E.-Färbung. Dichte Silberkornbelegung (große RNS-Neubildung) in Dünndarmepithelien, Ganglienzellen des Plexus myentericus und Zellkernen der Pankreasepithelien.

Ganglienzellen des Plexus myentericus und eine kaum geringere Schwärzung der Zellkerne des exokrinen Pankreasgewebes (Abb. 5). Unter akuter Äthioninvergiftung bleibt die Schwärzungsintensität über Dünndarmepithel und Ganglienzellen gleich, während über dem Pankreasgewebe autoradiographisch kaum noch Silberkörner nachweisbar sind (Abb. 6). Während die Silberkornbelegung über dem restierenden Pankreasgewebe unter der chronischen Vergiftung weiterhin abnimmt, bleibt sie über dem Dünndarmepithel und den Ganglienzellen unverändert.

Im Leberparenchym beobachtet man sowohl nach akuter als auch nach chronischer Äthioninvergiftung eine sehr starke Abnahme des Ein-

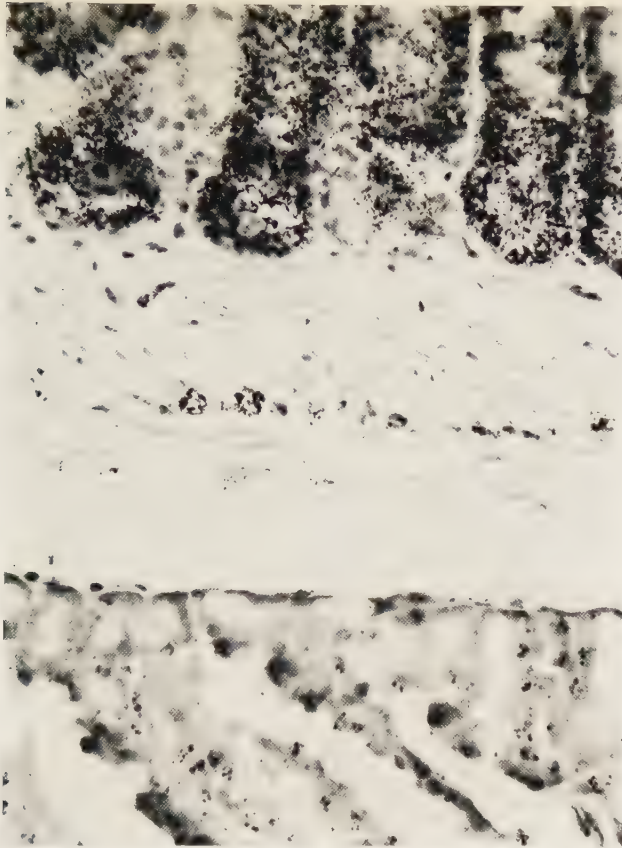


Abb. 6. Autoradiogramm von Pankreas und Dünndarm, 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin bei akuter Äthioninvergiftung, 120 Minuten nach letzter Äthionininjektion. H.-E.-Färbung. Große Silberkorndichte über Dünndarmepithelien und Ganglienzellen des Plexus myentericus bei fast völlig fehlender autoradiographischer Schwärzung über dem Pankreasgewebe.

baues von ^3H -Cytidin in RNS. In den einzelnen Leberepithelien lassen sich sowohl 60 Minuten als auch 4 Stunden nach Injektion kaum Silberkörner über Zellkern bzw. Cytoplasma nachweisen. Im Gegensatz hierzu scheint der Einbau in die RNS der Sternzellen unverändert zu sein (Abb. 7). Vor allem bei akuter Vergiftung zeigt sich bei der quantitativen Auswertung der Autoradiogramme eine absolute Umkehrung des normalen Verhältnisses zwischen Leber- und Sternzellen hinsichtlich der Silberkornzahl pro Zellkern (Fig. 2). Die Sternzellkerne, die unter normalen Bedingungen etwa die Hälfte der Silberkörner der Leberepithelkerne aufweisen, zeigen jetzt 15mal mehr Silberkörner pro Zellkern als

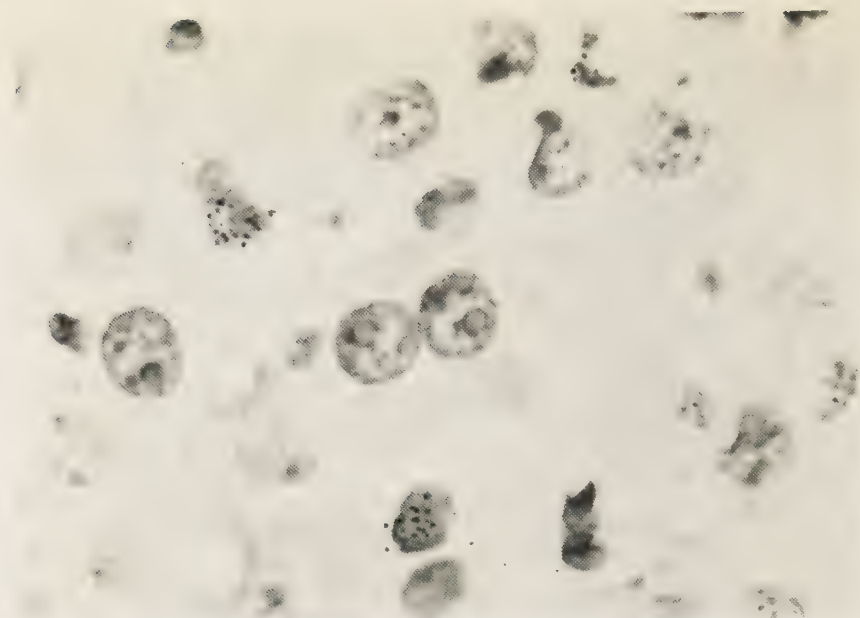


Abb. 7. Autoradiogramm der Leber, 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin bei akuter Äthioninvergiftung. H.-E.-Färbung. Fehlende Cytidininkorporation in Leberepithelien bei unveränderter Silberkornbelegung der Sternzellen. Aufhellungen des Karyoplasmas und des Nukleoluszentrums in Leberepithelien.

die Leberepithelien. Bei chronischer Vergiftung nimmt die relative Größe der RNS-Neubildung in Leberepithelien etwas zu, erreicht jedoch nie diejenige der Sternzellen. In der Erholungsphase (3 Tage nach letzter Äthionininjektion) kommt es zu einer außerordentlichen Steigerung der RNS-Neubildung im Zellkern der Leberepithelien, die jetzt eine fast 10mal größere Cytidininkorporationsrate besitzen als die Sternzellen. Die deutlich vergrößerten Nukleolen sind in den Autoradiogrammen dicht mit Silberkörnchen bedeckt und erscheinen als kompakte schwarze Kugeln im Autoradiogramm selbst bei kurzen Belichtungszeiten (Abb. 8).

Nach Behandlung mit Ribonuklease trat sowohl bei den untersuchten Geweben der unbehandelten Kontrolltiere als auch bei den entsprechenden Geweben der mit Äthionin vergifteten Tiere praktisch keine autoradiographische Schwärzung auf. Nur innerhalb der Lieberkühnschen Krypten der Dünndarmschleimhaut und im Bereiche der Foveolae gastricae wurden bei allen Tieren einzelne mit Silberkörnchen bedeckte Zellkerne gefunden. Bei den Tieren, die 3 Tage nach der letzten Äthionininjektion untersucht worden waren, fanden sich auch im Leberparen-

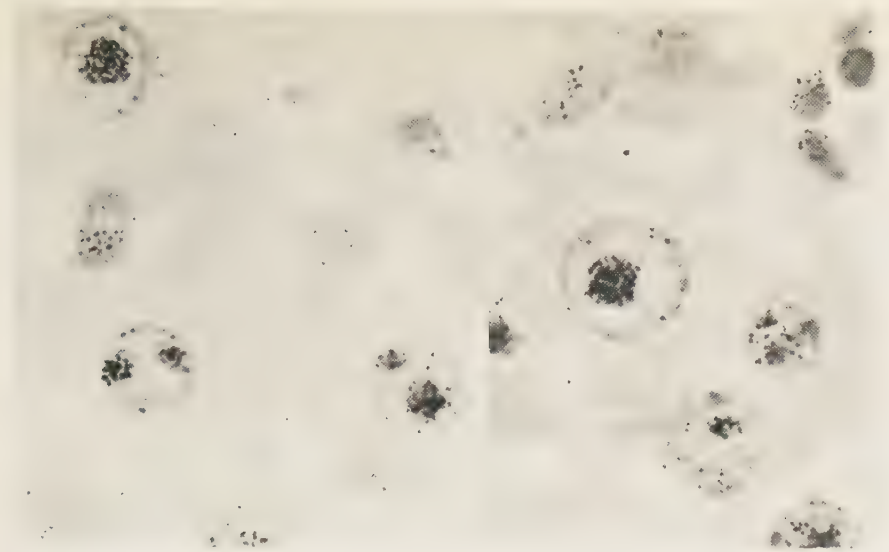


Abb. 8. Autoradiogramme von Leberepithelien, 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin in der Erholungsphase, 3 Tage nach letzter Äthioninapplikation. H.-E.-Färbung. Sehr starke Cytidininkorporation mit besonders dichter Markierung der vergrößerten Nukleolen in Leberepithelien. Unveränderter Cytidineinbau in Sternzellen.

chym eine Reihe markierter Zellkerne vor allem in peripheren Läppchenabschnitten. Bei diesen, auch nach Ribonukleasebehandlung markierten Zellkernen handelte es sich um solche, die Cytidin in DNS während der DNS-Synthesephase eingebaut hatten. Im übrigen dürfte das Ergebnis dieser Untersuchung als Beweis dafür gelten, daß dem Einbau von ^3H -Cytidin und damit der in unseren Versuchen nachweisbaren Kernmarkierung eine RNS-Neubildung zugrunde liegt, daß wir also mit unseren Versuchen und mit der quantitativen Auswertung durch Silberkornzählungen die RNS-Synthese und ihre relative Größe erfassen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (NIKLAS u. OEHLERT 1956; SCHULTZE, OEHLERT u. MAURER 1961) konnten wir in unseren autoradiographischen Untersuchungen unter Verwendung von ^3H -Leucin nachweisen, daß in Epithelien des exokrinen Pankreas, in den Hauptzellen des Drüsenmagens, im Dünndarmepithel und in Ganglienzellen des

Plexus myentericus ein besonders großer Eiweißumsatz stattfindet. Die relative Größe der Eiweißneubildung in Leberepithelien, Sternzellen und im mehrschichtigen Pflasterepithel des Vormagens ist demgegenüber erheblich geringer (Tab. 2). Die unter Verwendung von ^3H -Cytidin untersuchte RNS-Neubildung ist in den Dünndarmepithelien und in den Ganglienzellen des Plexus myentericus erheblich größer als in Leberepithelien, Sternzellen, Pankreasepithelien und im mehrschichtigen Pflasterepithel des Vormagens (Tab. 2).

Tabelle 2

Vergleiche zwischen relativer Größe der Protein- und RNS-Synthese und der Empfindlichkeit gegenüber der Äthionineinwirkung bei verschiedenen Zellarten. Den in Spalte 2 und 3 angegebenen Zahlen sind die in einer früheren Arbeit (SCHULTZE, OEHLERT u. MAURER 1961) aus relativen Silberkorndichten errechneten Werte zugrunde gelegt, wobei die Silberkorndichte der Leberepithelzelle = 100 gesetzt wurde. Durch Schwärzungsvergleiche wurden in vorliegender Arbeit untersuchte zusätzliche Zellarten (Ganglienzellen und Sternzellen) diesen Werten angeglichen.

Zellart	Relative Größe der Synthese von		Wirkung der Äthioninvergiftung		
	Protein (Leucin)	RNS (Cytidin)	Protein-synthese	auf RNS-Synthese	Kern und Cytoplasma-Veränderungen
Pankreasepithel	440	150	Hemmung	Hemmung	+++
Hauptzellen	400	150	Hemmung	Hemmung	+++
Dünndarmepithel	410	440	unverändert	unverändert	—
Ganglienzellen (Pl. myent.)	400	440	unverändert	unverändert	—
Sternzellen (Leber)	150	100	unverändert	unverändert	—
Leberepithel	100	100	Hemmung	Hemmung	+++
Vormagenepithel	80	100	unverändert	unverändert	—

Unter akuter und chronischer Einwirkung von Äthionin beobachtet man Zell- und Gewebsveränderungen im Pankreasepithel, in den Hauptzellen des Drüsenmagens und in Leberepithelien, während die Ganglienzellen des Plexus myentericus, die Dünndarmepithelien, die Epithelien des mehrschichtigen Pflasterepithels keine histologisch faßbaren Veränderungen erkennen lassen. Die cytologischen Veränderungen sind charakterisiert durch einen Verlust der cytoplasmatischen Basophilie mit Bildung fettfreier Vakuolen sowie durch eine Abnahme der Kernbasophilie mit

Vakuolisierung des Nukleolus und des Zellkerns. Die Zellschädigung kann bis zum Zelltod gehen und zu Einzel- und Gruppennekrosen von Pankreas-, Leber- und Hauptzellen im Drüsenmagen führen. Hierbei kommt es zu entzündlichen Infiltraten und zur Bindegewebsneubildung.

Sowohl unter akuter als auch unter chronischer Äthioninvergiftung werden in Leberepithelien, Pankreasepithelien und Hauptzellen des Drüsenmagens sowohl die Eiweißneubildung als auch die RNS-Synthese im Zellkern gehemmt (Tab. 2, Fig. 1, 2).

In der Erholungsphase, 3 Tage nach Absetzen der Äthioninapplikation, wird eine starke Zunahme der RNS-Neubildung vor allem in den Leberepithelien beobachtet, die mit Nukleolenvergrößerungen einhergeht (Fig. 2).

Besprechung der Ergebnisse

Das Schädigungsmuster bei akuter und chronischer Äthioninvergiftung

Sowohl in Untersuchungen über die morphologischen Veränderungen verschiedener Gewebe unter akuter und chronischer Äthioninvergiftung (ALVIZOURI u. WARREN 1954; LORING u. HARTLEY 1955; POPPER, DE LA HUERGA u. KOCH-WESER 1952; SEIFERT 1960) als auch in Verteilungsstudien mit radioaktiv markiertem Äthionin (FITZGERALD, HELLMAN, WEINSTEIN u. SCHIMMEL 1954; FITZGERALD u. HELLMAN 1961) wurden Ergebnisse erhalten, die für eine Parallelität zwischen Größe der Eiweißneubildung und Ausmaß der Schädigung sprachen. Dies führte zu der Annahme, daß grundsätzlich diejenigen Gewebs- und Zellelemente, die eine besonders große Proteinsynthese besitzen, am empfindlichsten gegenüber der Äthioninintoxikation sind und demnach am ehesten und stärksten mit Veränderungen reagieren. Andererseits lagen bereits Beobachtungen vor, die eine derartige enge Beziehung zwischen Größe der Eiweißneubildung und Empfindlichkeit gegenüber Äthionin unwahrscheinlich machten. So wurde bereits 1954 von ALVIZOURI u. WARREN auf die Tatsache hingewiesen, daß auch bei chronischer Äthioninvergiftung mit schwersten Veränderungen am exokrinen Pankreasgewebe keinerlei morphologische Veränderungen an den Ganglienzellen des ZNS der betreffenden Tiere nachweisbar waren. Zum damaligen Zeitpunkt war allerdings die Tatsache noch unbekannt, daß die Ganglienzellen des ZNS und auch des Plexus myentericus zu den Zellen im Organismus gehören, die den größten Eiweißumsatz überhaupt besitzen (NIKLAS u. OEHLERT 1956; FICQ u. BRACHET 1956).

In den Verteilungsstudien von FITZGERALD u. HELLMAN (1961) mit ^{35}S -Äthionin wurde ein relativ großer Einbau von Aktivität in die Dünn- und Dickdarmepithelien gefunden. Dies entspricht zwar der Größe der Proteinsynthese dieser Zellen, nicht aber der Beobachtung, daß in ihnen keine morphologischen Veränderungen als Folge der Äthioninintoxikation auftreten.

Die in unseren Versuchen erhaltenen Ergebnisse (Tab. 2) zeigen, daß grundsätzliche Beziehungen zwischen Größe der RNS- und Proteinsynthese und Ausmaß der Zellschädigung durch Äthionin nicht existieren. Die eindrucksvollsten Beispiele für die Richtigkeit unserer Aussage liefern die Ganglienzellen des Plexus myentericus und die Sternzellen der Leber.

Das Fehlen jeglicher Veränderungen an den Ganglienzellen des Plexus myentericus bei akuter und chronischer Äthioninapplikation ist ein Beweis dafür, daß die Unempfindlichkeit der Ganglienzellen des ZNS gegenüber Äthionin (ALVIZOURI u. WARREN 1954) nicht eine Folge der Undurchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Äthionin, sondern anscheinend in der Besonderheit ihres Stoffwechsels begründet ist. Die Unempfindlichkeit der Sternzellen gegenüber Äthionin ist bei den schweren Veränderungen am Leberepithel ein Beweis dafür, daß unterschiedliche Konzentrationen des Äthionin am Orte der Einwirkung keine entscheidende Rolle bei der unterschiedlichen Wirksamkeit spielen können. Der Eiweißumsatz der Sternzellen liegt in etwa der gleichen Höhe wie der der Leberepithelien, die relative Größe der RNS-Neubildung dagegen liegt in den Sternzellen niedriger als in Leberepithelien.

Wir können somit zunächst einmal feststellen, daß die unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen Zellarten gegenüber der Äthionineinwirkung nicht mit der Größe ihres RNS- oder Proteinstoffwechsels erklärt werden kann. Damit ergibt sich die Frage, welche Eigenschaften einer Zelle denn für ihr unterschiedliches Verhalten bei der Äthioninintoxikation verantwortlich zu machen sind. Die Beantwortung dieser Frage setzt die Kenntnis des Mechanismus voraus, welcher nach Äthioninapplikation zu den morphologischen Veränderungen am Cytoplasma und Zellkern der betreffenden Zellarten führt.

Die Wirkung von Äthionin auf Strukturen und Stoffwechsel der Zelle

Alle bisher durchgeführten licht- und elektronenoptischen Untersuchungen bei akuter und chronischer Äthioninvergiftung an Pankreasepithelien und Zellen seröser Speicheldrüsen (GOLDBERG u. CHAIKOFF

1951; SEIFERT u. GIESEKING 1961; HERMAN u. FITZGERALD 1962 u. a.), an Epithelien der laktierenden Milchdrüse (BÄSSLER u. GRILLMAIER 1962) und Hauptzellen des Drüsenmagens (KAUFMAN, KLAVINS u. KINNEY 1956) haben ergeben, daß zunächst und am stärksten die cytoplasmatischen Strukturen des Ergastoplasmas geschädigt werden. Den hierbei im elektronenmikroskopischen Bild nachweisbaren Fragmentationen und Vakuolisierungen am endoplasmatischen Retikulum, die zu einem völligen Abbau des Ergastoplasmas führen können (SEIFERT u. GIESEKING 1961; HERMAN u. FITZGERALD 1962; BÄSSLER u. GRILLMAIER 1962), gehen im lichtmikroskopischen Bild ein Schwund der cytoplasmatischen Granula und eine Verarmung an basophilen Substanzen parallel. Die Veränderungen am Zellkern äußern sich im elektronenmikroskopischen Bild in einer Auflockerung und Auflösung des Karyoplasmas (BÄSSLER u. GRILLMAIER 1962); bei der lichtmikroskopischen Untersuchung entsprechen diesen Veränderungen die auch von uns beschriebenen Kernvakuolisierungen und Nukleolusveränderungen. Die gleichen Veränderungen wurden von anderen Untersuchern an den Leberepithelien der Ratte (POPPER, DE LA HUERGA u. KOCH-WESER 1952) und des Hundes und Kaninchens (ALVIZOURI u. CORTES 1964) beobachtet, wobei die dort beschriebenen strukturellen Abbauvorgänge in jeder Hinsicht den von uns hier beschriebenen entsprechen.

Die allen durch Äthionineinwirkung betroffenen Zellarten gemeinsame Schädigung besteht somit in einer Verarmung des Cytoplasmas und Zellkerns an RNS, die mit einem Abbau der RNS-reichen Strukturen des Cytoplasmas verknüpft ist.

Nun kennen wir derartige RNS-Verluste, vor allem des Cytoplasmas, als Ursache für strukturelle Zellveränderungen bei einer ganzen Reihe von Zellschädigungen, die zum Teil auf eine Überfunktion der entsprechenden Zellen, zum Teil auf die Einwirkung bestimmter Substanzen zurückzuführen sind. So wurden nach Teilhepatektomie im restierenden Lebergewebe cytoplasmatische Vakuolisierungen zusammen mit einem RNS-Verlust beobachtet, die durch eine gesteigerte Syntheseleistung des Cytoplasmas bei ungenügender Nachlieferung von RNS aus dem Zellkern bedingt sind (OEHLERT, HÄMMERLING u. BÜCHNER 1962). Von ALTMANN u. OSTERLAND (1961) wurden nach Thioacetamidapplikation in Leberepithelien der Ratte cytoplasmatische Veränderungen beschrieben, denen eine RNS-Verarmung entspricht. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden hierbei Abbauvorgänge und eine Desorganisation des Ergastoplasmas gefunden (THOENES u. BANNASCH 1962). STÖCKER (1963, 1963/1964) konnte in autoradiographischen Untersuchungen nachweisen,

daß der RNS-Verarmung des Cytoplasmas eine Abgabehemmung der im Kern vermehrt gebildeten RNS zugrunde liegt.

In histologischen, cytophotometrischen und autoradiographischen Untersuchungen an der Rattenleber konnte gezeigt werden, daß Diäthyl-nitrosamin, ein alkylierendes Lebercarcinogen, eine RNS-Verarmung mit dem Verlust basophiler Schollen im Cytoplasma bei gesteigerter RNS-Synthese im Kern hervorruft (GRUNDMANN u. SIEBURG 1962; HOBIG u. GRUNDMANN 1962; OEHLERT u. HARTJE 1963). Auch hierbei geht dem Verlust an cytoplasmatischer RNS eine Destruktion der Strukturen des Ergastoplasmas parallel (MÖLBERT, HILL u. BÜCHNER 1962). Praktisch die gleichen Veränderungen beobachtet man nach Applikation von Dimethylnitrosamin (EMMELOT u. BENEDETTI 1960).

Allen geschilderten Veränderungen liegt somit, gleichgültig durch welche Einwirkungen sie hervorgerufen werden, ein Mißverhältnis zwischen Verbrauch und Nachschub der cytoplasmatischen RNS zugrunde. Entweder übersteigt der Verbrauch die aus dem Zellkern erfolgende Nachlieferung, oder aber bei gesteigerter RNS-Neubildung im Zellkern ist die Abgabe der RNS gehemmt wie bei der Thioacetamidvergiftung, oder der Abbau cytoplasmatischer RNS durch eine Alkylierung am Guanin übersteigt die unter Umständen gesteigerte RNS-Neubildung im Zellkern wie bei der Dimethylnitrosamin bzw. Diäthylnitrosaminvergiftung (MAGEE u. FARBER 1962; OEHLERT u. HARTJE 1963). Folge des cytoplasmatischen RNS-Verlustes ist in jedem Falle eine verminderte Proteinsynthese (OEHLERT u. HARTJE 1963; STÖCKER 1963/1964; MAGEE 1958). Von besonderem Interesse ist bei den geschilderten Beobachtungen, daß sowohl bei der Teilhepatektomie als auch bei Vergiftungen mit Thioacetamid und Dimethyl- bzw. Diäthylnitrosamin die Verarmung des Cytoplasmas an RNS eine gesteigerte RNS-Neubildung im Zellkern auslöst als Ausdruck bestehender Wechselwirkungen zwischen Cytoplasma und Zellkern.

Etwas anders liegen nun die Verhältnisse bei der Äthioninvergiftung mit der von uns angewandten Dosierung. Hierbei konnten wir zwar einen Verlust der cytoplasmatischen Basophilie und eine Hemmung der Proteinsynthese in Leber- und Pankreasepithelien und in den Hauptzellen des Drüsenmagens beobachten, gleichzeitig aber fand sich in diesen Zellelementen eine fast vollständige Hemmung der RNS-Synthese im Zellkern, gemessen am Einbau von ^3H -Cytidin. Dabei stehen unsere Versuchsergebnisse in Übereinstimmung mit denen von VILLA-TREVINO, SHULL u. FARBER 1962, die ebenfalls eine Hemmung der RNS-Synthese im Zellkern unter der Äthioninapplikation nachweisen konnten. Wir müssen somit annehmen, daß die bei der Äthioninvergiftung zu beob-

achtenden Zellveränderungen ursächlich auf zweierlei Weise zustande kommen.

Einmal dürfte über eine Alkylierung des Guanin eine Veränderung an der cytoplasmatischen RNS eintreten (FARBER u. MAGEE 1960), die einen Abbau der cytoplasmatischen Strukturen zur Folge hat. Zum anderen müssen wir eine direkte Einwirkung des Äthionin, möglicherweise ebenfalls über eine Alkylierung, auf die RNS-Neubildung im Zellkern annehmen, wodurch ein Ersatz der cytoplasmatischen RNS verhindert wird. Wie man sich die Hemmwirkung des Äthionin auf die Kern-RNS-Synthese vorzustellen hat, kann auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht gesagt werden. Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß nach Absetzen der Äthioninapplikation eine gegenüber der Norm erheblich gesteigerte RNS-Synthese mit Nukleolenvergrößerungen einsetzt. Das ist ein Hinweis dafür, daß die Äthioninschädigung zumindest in der Mehrzahl der Leberepithelien nicht irreversibel ist, und vor allem für die Annahme, daß die Hemmwirkung nur so lange anhält, als Äthionin verabreicht wird.

Bei einer Betrachtung unserer Versuchsergebnisse fällt auf, daß die Blockierung der RNS-Neubildung durch Äthionin in keiner Beziehung zur relativen Größe der RNS-Synthese steht. Diejenigen Zellelemente, welche die größte RNS-Neubildung erkennen lassen, wie Ganglienzellen des Plexus myentericus und Dünndarmepithelien, sind gegenüber der Äthioninintoxikation weitgehend unempfindlich.

Überblickt man das gesamte Äthioninschädigungsmuster beim Warmblüter, dann fällt auf, daß es sich mit Ausnahme der Leberepithelien um Epithelien mit sekretorischer Funktion handelt, bei denen strukturelle und Stoffwechseleränderungen auftreten. Dabei spielt anscheinend die Tatsache eine Rolle, daß besonders eiweißreiche Fermente produziert werden, wie in Pankreasepithelien, serösen Speicheldrüsen, Hauptzellen des Drüsenmagens und in Epithelien der laktierenden Brustdrüse. Auch diese Überlegung führt uns jedoch bei der Erklärung des Schädigungsmechanismus nicht weiter, zumal die Leberepithelien eine Ausnahme bilden.

Mit großer Wahrscheinlichkeit spielt die Mitwirkung bestimmter Fermentsysteme beim Wirksamwerden des Äthionin und anderer alkylierender Substanzen eine entscheidende Rolle, ähnlich wie dies von DRUCKREY, PREUSSMANN, SCHMÄHL u. MÜLLER (1961) für die Wirkung der Nitrosamine wahrscheinlich gemacht werden konnte. Möglicherweise kommt auch der Aktivierung derartiger Fermente durch Hormone eine Bedeutung zu, wie dies zum Beispiel für Fermentaktivierungen durch

Oestrogen in der Rattenniere nachgewiesen werden konnte (v. DEIMLING u. NOLTENIUS, 1964).

Ein derartiger Mechanismus würde auch die Beobachtung erklären, daß Äthionin bei der weiblichen, nicht aber bei der männlichen Ratte Leberverfettungen hervorruft (FARBER, KOCH-WESER u. POPPER 1951), die durch Applikation von Androgenen unterdrückt werden können (FARBER u. SEGALOFF 1955).

Eine endgültige und befriedigende Aufklärung des Schädigungsmechanismus vom Äthionin ist mit den bisher zur Verfügung stehenden Befunden nicht möglich. Immerhin zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchungen und die hieran geknüpften Überlegungen, wie vielfältig und kompliziert Angriffspunkte und Wirkungsmechanismus einer Substanz wie des Äthionin sind, nachdem zunächst angenommen worden war, daß der Zellschädigung nur ein fehlerhafter Einbau des Äthionin statt Methionin in Proteine zugrunde liege (V. BECKER 1956).

Von besonderem Interesse ist weiter die Tatsache, daß zahlreiche chemisch unterschiedliche Substanzen, wie Äthionin, Diäthyl- und Dimethylnitrosamin und Thioacetamid, denen ein Eingriff in den RNS-Stoffwechsel der Zelle gemeinsam ist, bei entsprechend langer Applikation zur carcinomatösen Umwandlung der Leberepithelzelle führen. Hierbei dürfte den über den Abbau cytoplasmatischer Strukturen zur Wirkung kommenden Störungen der Wechselwirkung zwischen Cytoplasma und Zellkern mit der damit verbundenen Enthemmung der Zellteilung (BÜCHNER 1960, 1961) eine besondere Bedeutung zukommen.

Zusammenfassung

In qualitativen und quantitativen autoradiographischen Untersuchungen unter Verwendung von ^3H -Leucin und ^3H -Cytidin als Vorläufer der Protein- und RNS-Synthese wurde sowohl bei chronischer als auch bei akuter Äthioninvergiftung bei der Ratte in zahlreichen Zellarten eine Hemmung bzw. vollständige Sistierung der Protein- und RNS-Neubildung nachgewiesen.

Im Gegensatz zu früheren Anschauungen entspricht das Äthioninschädigungsmuster im Warmblüterorganismus nicht der relativen Größe der Proteinsynthese der entsprechenden, geschädigten Zellarten. Zellen wie die Ganglienzellen des Plexus myentericus und Epithelien des Dünndarms mit großem Protein- und RNS-Umsatz werden nicht geschädigt. Der in Pankreas-Leber-Epithelien und Hauptzellen des Drüsenmagens beobachteten RNS-Verarmung des Cytoplasmas und den damit parallel gehenden Abbauvorgängen am Ergastoplasma liegt eine Hemmung der RNS-Neubildung im Zellkern durch Einwirkung von Äthionin zugrunde. In der Erholungsphase (3 Tage nach letzter Äthionininjektion) kam es vor allem in Leberepithelien zu einer überschießenden RNS-Synthese mit Kern- und Nukleolenvergrößerung.

Der Mechanismus der durch Äthionin hervorgerufenen RNS-Synthesehemmung sowie die Ursache für das beobachtete Schädigungsmuster konnten nicht befriedigend erklärt werden. Die Übereinstimmung zwischen den durch Äthionin und durch andere Substanzen (Dimethyl- und Diäthylnitrosamin und Thioacetamid) am Lebergewebe hervorgerufenen Zellveränderungen wird unter Berücksichtigung der Carcinogenität aller dieser Substanzen besprochen.

Summary

Qualitative and quantitative autoradiographic studies by means of ^3H -leucine and ^3H -cytidin – the preliminary substance for protein and RNA synthesis – demonstrated an inhibition or complete cessation of protein and RNA neoformation in numerous types of cells in chronic as well as acute ethionine intoxications in rats.

Contrary to former opinions, the pattern of the ethionine damage in the warm-blooded organism does not correspond to the relative extent of protein synthesis of the relevant damaged cell types. Cells such as the ganglia cells of the myenteric plexus and epithelial cells of the small intestine which have a large protein and RNA metabolism, are not damaged. The RNA reduction in the cytoplasm observed in the pancreas – liver epithelia and in the gastric main cells and the catabolic processes in the archiplasm which run parallel to this reduction, are based on an inhibition of the RNA neoformation in the cell nucleus due to the action of ethionine. During the recovery phase (3 days after the last ethionine injection) excessive RNA synthesis with an increase of the nucleus and nucleoli occurred above all in the liver epithelia.

The mechanism of the inhibition of the RNA synthesis induced by ethionine as well as the cause of the damage pattern observed could not be clarified satisfactorily. The conformity of the cell changes in the liver tissue induced by ethionine and by other substances (dimethylnitrosamine, diethylnitrosamine, and thioacetamide) is discussed with a view to the carcinogenicity of all of these substances.

Résumé

On a mis en évidence par des études qualitatives et quantitatives avec utilisation de ^3H -leucine et de ^3H -cystine comme précurseur de la synthèse protéinique et RNS une inhibition ou un arrêt complet de la néoformation protéinique et RNS tant dans les intoxications chroniques qu'aigues par l'éthionine chez le rat dans de nombreuses espèces de cellules.

Contrairement à des hypothèses antérieures la nature des lésions éthioniques dans l'organisme des animaux à sang chaud ne correspond pas à l'importance relative de la synthèse protéinique des différentes espèces cellulaires lésées. Des cellules comme les cellules ganglionnaires du plexus mésentérique et des épithéliums tel celui de l'intestin grêle avec d'importantes synthèses protéiniques et RNS ne sont pas touchées. Dans les épithéliums pancréatique et hépatique et dans les cellules principales de l'estomac muqueux on a observé un appauvrissement du cytoplasme en RNS ainsi que des phénomènes cataboliques au niveau de l'ergastoplasme qui leur sont parallèles et sont dues à une inhibition de la néoformation dans le noyau cellulaire de l'éthionine. A la phase de rémission (3 jours après la dernière injection d'éthionine) se produit avant tout dans les épithéliums hépatiques une synthèse RNS exagérée avec hypertrophie nucléaire et nucléonique.

Le mécanisme de l'inhibition de la synthèse RNS provoquée par l'éthionine ainsi que la cause du type de lésions observées n'ont pas pu être expliqués d'une façon satisfaisante. La concordance entre les lésions cellulaires provoquées par l'éthionine et par d'autres substances (diméthyl et diéthylnitrosamine et thioacétamide) au niveau du parenchyme hépatique est discutée compte tenu du potentiel carcinogénétique de toutes ces substances en cause.

Literatur

- ALTMANN, H.-W. und OSTERLAND, U., Über cytoplasmatische Wirbelbildungen in den Leberzellen der Ratte bei chronischer Thioacetamidvergiftung. *Beitr. path. Anat.* **124**, 1 (1961).
- ALVIZOURI, M. and CORTES, J., Effect of dl-ethionine on the liver of dog and rabbit. *A.M.A. Arch. Path.* **77**, 57 (1964).
- and WARREN, S., Effects of dl-ethionine on the pancreas and other organs. *A.M.A. Arch. Path.* **57**, 130 (1954).
- BÄSSLER, R. und GRILLMAIER, H., Der Einfluß von Äthionin auf Struktur und Funktion der Milchdrüse. *Beitr. path. Anat.* **127**, 1 (1962).
- BECKER, V., Die chronische Äthioninvergiftung der Ratte. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **40**, 247 (1956).
- BÜCHNER, F., Die Morphologie der Krebsentstehung. *Therapiewoche* **10**, 12 (1960).
- , Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle in der Synopsis klassischer und moderner Methoden. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **45**, Tag., 37 (1961).
- VON DEIMLING, O., u. H. NOLTENIUS: Hormonabhängige Enzymverteilung in Geweben. I. *Histochemie* **3**, 500 (1964).
- DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D. und MÜLLER, M., Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen. *Naturwissenschaften* **48**, 134 (1961).
- EMMELOT, P. and BENEDETTI, E. L., Changes in the fine structure of rat liver brought about by dimethylnitrosamine. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 393 (1960).
- FARBER, E., Carcinoma of the liver in rats fed ethionine. *Arch. Path.* **62**, 445 (1956).
- , KOCH-WESER, D. and POPPER, H., The influence of sex and of testosterone upon fatty liver due to ethionine. *Endocrinology* **48**, 205 (1951).
- and MAGEE, P. N., The probable alkylation of liver ribonucleic acid by the hepatic carcinogens dimethylnitrosamine and ethionine. *Proc. Biochem. Soc.* **393**, 58 (1960).
- and SEGALOFF, A., Effect of androgens and growth and other hormones on ethionine fatty liver in rats. *J. Biol. Chem.* **216**, 471 (1955).
- FICQ, A. et BRACHET, J., Distribution de l'acide ribonucléique et incorporation de la phénylalanine-2-C¹⁴ dans les protéines. *Exper. Cell Res.* **11**, 135 (1956).
- FITZGERALD, P. J. and HELLMAN, L., The organ concentration, cellular distribution and excretion of S³⁵-administered as ethionine-S³⁵. *Laborat. Invest.* **10**, 2 (1961).
- —, WEINSTEIN, J. and SCHIMMEL, R., The concentration, distribution and excretion of radioethionine (S³⁵) in the rat on stock and protein-depleted diets-determined by radioactivity counting and radioautography. *Amer. J. Path.* **30**, 619 (1954).
- GOLDBERG, R. C. and CHAIKOFF, I. L., Selective pancreatic acinar destruction by dl-ethionine. *A.M.A. Arch. Path.* **51**, 230 (1951).
- GRUNDMANN, E. und SIEBURG, H., Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **126**, 57 (1962).
- HERMAN, L. and FITZGERALD, P. J., The degenerative changes in pancreatic acinar cells caused by dl-ethionine. *J. Cell Biol.* **12**, 277 (1962).
- HOBICK, H. P. und GRUNDMANN, E., Quantitative Veränderungen der DNS und der RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. path. Anat.* **127**, 25 (1962).

- KAUFMAN, N., KLAVINS, J. V. and KINNEY, T. D., Ethionine-induced changes in gastrointestinal tract. *Arch. Path.* **74**, 57 (1962).
- KRAMSCH, D., BECK, V. und OEHLERT, W., Einfluß der Äthioninvergiftung und des Nahrungsentzuges auf die DNS-Neubildung in den Wechselgeweben und parenchymatösen Organen der Ratte. *Beitr. path. Anat.* **128**, 416 (1963).
- LORING, W. E. and HARTLEY, L. J., The destructive effects of dl-ethionine on the pancreas, stomach and submaxillary glands. *Amer. J. Path.* **31**, 521 (1955).
- MAGEE, P. N., Toxic liver injury. Inhibition of protein synthesis in rat liver by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* **70**, 606 (1958).
- and FARBER, E., Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* **83**, 106 (1962).
- MÖLBERT, E., HILL, K. und BÜCHNER, F., Die Kanzerisierung der Leberparenchymzelle durch Diäthylnitrosamin im elektronenmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **126**, 218 (1962).
- NIKLAS, A. und OEHLERT, W., Autoradiographische Untersuchungen der Größe des Eiweißstoffwechsels verschiedener Organe, Gewebe und Zellarten. *Beitr. path. Anat.* **116**, 92 (1956).
- OEHLERT, W., HÄMMERLING, W. und BÜCHNER, F., Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der DNS-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie. *Beitr. path. Anat.* **126**, 91 (1962).
- und HARTJE, J., Die Veränderungen des Eiweiß-Ribonukleinsäure-Stoffwechsels der Leberepithelzelle während der experimentellen Kanzerisierung durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. path. Anat.* **128**, 376 (1963).
- POPPER, H., DE LA HUERGA, J. and KOCH-WESER, D., Hepatic and pancreatic changes produced in rats by ethionine and their relation to human lesions. *Amer. J. Path.* **28**, 518 (1952).
- SCHULTZE, B., OEHLERT, W. und MAURER, W., Über eine allgemeine Beziehung zwischen der Umsatzrate der Ribonukleinsäure und des Eiweißes im Organismus von Maus und Ratte. *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 35 (1961).
- SEIFERT, G., Veränderungen der großen Kopfspeicheldrüsen nach experimenteller Äthionineinwirkung. *Virchows Arch. path. Anat.* **333**, 497 (1960).
- und GIESEKING, R., Elektronenmikroskopische Befunde am Rattenpankreas nach experimenteller Äthioninschädigung. *Beitr. path. Anat.* **124**, 81 (1961).
- STÖCKER, E., Autoradiographische Untersuchungen zur funktionellen und pathologischen Kernschwellung in der Rattenleber nach Fütterung mit Thioacetamid. *Zschr. Zellforsch.* **62**, 80 (1964).
- , Autoradiographische Studien zum Einfluß von Thioacetamid auf den zellulären Eiweiß- und Nukleinsäurestoffwechsel in Leberzellen der Ratte. *Beitr. path. Anat.* **129**, 247 (1963/1964).
- THOENES, W. und BANNASCH, P., Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen am Cytoplasma der Leberzellen nach akuter und chronischer Thioacetamid-Vergiftung. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 556 (1962).
- VILLA-TREVINO, S., SHULL, S. and FARBER, E., On the mechanism of inhibition of hepatic protein synthesis by ethionine. *Fed. Proc.* **22**, 237 (1963).

